

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 851 046**

②① N° d'enregistrement national : **03 01454**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : G 01 N 33/569

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 07.02.03.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 13.08.04 Bulletin 04/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SOCIÉTÉ D'ÉTUDE ET DE DÉVE-  
LOPPEMENT DES ANTIGÈNES COMBINATOIRES -  
SEDAC THERAPEUTICS Société anonyme — FR,  
UNIVERSITÉ DE LILLE 2 DROIT ET SANTÉ — FR et  
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE  
DE LILLE — FR.

⑦② Inventeur(s) : CHEHADEH WASSIM, BOUZIDI  
AHMED et HOBER DIDIER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LEPEUDRY.

⑤④ TEST DE DIAGNOSTIC IN VITRO D'INFECTIONS ENTEROVIRALES.

⑤⑦ L'invention concerne un test de diagnostic in vitro  
d'entérovirus, basé sur la révélation d'une réaction immuno-  
logique de type reconnaissance antigène-anticorps, mettant  
en oeuvre des antigènes ou des épitopes de ceux-ci qui  
n'induisent pas d'anticorps antiviraux neutralisants mais qui  
induisent des anticorps "facilitants" qui augmentent l'infec-  
tion virale.

FR 2 851 046 - A1



L'invention concerne un test de diagnostic in vitro d'entérovirus basé sur la révélation d'une réaction immunologique de type reconnaissance antigène-anticorps.

Les entérovirus forment le genre Entérovirus au sein  
5 de la famille des *Picornaviridae*. Il s'agit de virus de 25 à 30 nm de diamètre, non enveloppés, à symétrie icosaédrique et à ARN (acide ribonucléique) monocaténaire linéaire, non fragmenté et positif.

Leur absence d'enveloppe leur confère une résistance  
10 aux agents physico-chimiques; ils sont stables entre pH 3 et 10; ils sont inactivés par la chaleur au-delà de 45°C (et même 50°C en présence de cations divalents) et par les désinfectants et antiseptiques majeurs (povidone iodée, hypochlorite de sodium, aldéhydes).

15 Il existe 65 sérotypes d'entérovirus : 3 poliovirus, 23 coxsackievirus A (CVA), 6 coxsackievirus B (CVB), 29 échovirus (EV) et 4 entérovirus non classés.

Plus de 80% du génome des entérovirus d'environ 7500  
nucléotides est constitué d'un cadre de lecture unique  
20 flanqué de deux régions non codantes en 5' et 3'. La volumineuse protéine codée par ce cadre de lecture est clivée en 4 protéines matures structurales VP1, VP2, VP3 et VP4 (VP=viral protein) et en protéines non structurales comme des protéases et l'ARN polymérase.

25 Les entérovirus sont l'objet d'une grande variabilité génétique due aux erreurs de transcription de l'ARN polymérase virale sources de mutations ponctuelles et aux recombinaisons entre génomes de virus différents. Cette variabilité contribue à la diversité des tropismes  
30 tissulaires et des spectres pathologiques des entérovirus.

Les entérovirus ont un mode de transmission fécal-oral par contacts interhumains ou par le biais d'eaux ou d'aliments contaminés. Certains sérotypes ont une transmission respiratoire ou cutanéomuqueuse. Les  
35 entérovirus qui pénètrent par voie digestive se multiplient d'abord dans l'intestin (d'où le terme entérovirus), avant de diffuser, par voie hématogène, vers des organes cibles (système nerveux central, muscles striés, peau...). Les

infections inapparentes constituent la grande majorité des entéroviroses. Parmi les formes symptomatiques, on distingue les infections aiguës et les infections persistantes.

Les infections aiguës sont très polymorphes. Les entérovirus sont les agents infectieux les plus fréquents responsables d'infections du système nerveux central (méningites lymphocytaires, méningo-encéphalites, paralysies de type poliomyélite). Ils participent à de nombreuses autres pathologies : infections respiratoires (rhinites, bronchites, bronchiolites, pneumonies), infections cardiaques (péricardites, myocardites), myosites, éruptions maculo-papuleuses ou purpuriques, syndromes fébriles et, plus rarement, hépatites, néphrites, orchites ou arthrites. Des manifestations cliniques sont très spécifiques des entérovirus et même de certains sérotypes : pleurodynie ou maladie de Bornholm (CVB) qui correspond à une sorte de grippe hyperalgique, éruptions vésiculeuses de type herpangine ou syndrome pied-main-bouche (CVA, CVB, entérovirus 70), conjonctivite hémorragique (CVA-24, entérovirus 70).

Les pathologies humaines chroniques associées aux entérovirus sont au moins au nombre de quatre : méningo-encéphalites chroniques, syndrome post-poliomyélitique, affections cardiaques et diabète insulino-dépendant. En effet, il existe de forts arguments en faveur de l'implication des coxsackievirus B dans le diabète mellitus insulino-dépendant de type 1 (IDDM). Plusieurs auteurs ont détecté la présence d'ARN entéroviral de forte homologie avec CVB dans le sang périphérique de patients IDDM au début des manifestations cliniques de la maladie (Clements et al., 1995; Andreoletti et al., 1997; Nairn et al., 1999; Lonrot et al., 2000). Récemment la Demanderesse a montré que des taux élevés dans le plasma d'interféron  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) sont corrélés dans 50% des cas avec la présence de séquences entérovirales, en particulier CVB3 et CVB4, dans le sang circulant d'adultes et d'enfants atteints de diabète de type 1 (Chehadeh et al., 2000). La Demanderesse a également démontré que CVB4, par des interactions avec des anticorps

IgG circulants ou associés à des cellules, peut fortement induire la production d'IFN $\alpha$  par des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patients IDDM (Hober et al., J. Gen. Virol., 2002). La production d'interféron  $\alpha$  est un marqueur de l'infection virale. CVB4 induit peu cette production sauf quand il est mis en présence d'anticorps dits "facilitants" qui facilitent l'infection virale. CVB4 peut donc infecter des monocytes, en majorité CD14+, par un mécanisme anticorps-dépendant par des interactions entre le virus, des anticorps antiviraux et des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (CAR, Fc $\gamma$  RII, Fc $\gamma$  RIII) qui résultent en la production d'IFN $\alpha$ . Cette synthèse d'IFN $\alpha$  induite par des IgG anti-CVB4 reflète l'entrée de CVB4 dans les monocytes mais pas la réplication virale et requiert la présence d'ARN de CVB4 dans les cellules. Si l'on bloque la production d'IFN $\alpha$  induite par ces IgG anti-CVB4, des particules virales produites par les PBMC peuvent être détectées (Hober et al., 2001). De plus, l'activité inductrice d'IFN $\alpha$  de plasma de patients IDDM préincubé avec CVB4 avant d'être apporté à des PBMC isolées de sujets sains est élevée si on la compare à celle de plasma de sujets sains (Hober et al., 2002). Les patients IDDM ont une prévalence plus élevée de ces anticorps anti-CVB dits "facilitants" qui augmentent la synthèse d'IFN $\alpha$  induite par CVB par rapport aux contrôles. Les patients atteints d'infections entérovirales portent donc dans leur plasma, en plus des anticorps neutralisants connus jusqu'à présent qui "immobilisent" le virus et qui sont dans la majorité des cas dirigés contre des épitopes de la protéine structurale de surface VP1, des anticorps "facilitants" qui favorisent l'infection virale.

Les outils diagnostiques utilisés jusqu'à présent dans le diagnostic des entéroviroses sont des moyens directs : culture cellulaire, inoculation au souriceau nouveau-né, amplification génomique en utilisant des amorces dans la région 5' non codante du génome et des moyens indirects : séroneutralisation et techniques immuno-enzymatiques.

La culture cellulaire et la séroneutralisation ne sont

pas applicables à tous les coxsackievirus A, les sérotypes A1, A19 et A22 ne sont pas cultivables.

L'inoculation au souriceau nouveau-né est une technique lourde et longue qui permet de diagnostiquer une infection à coxsackievirus et permet de différencier les CVA (paralysies flasques) des CVB (paralysies spastiques).

Les techniques de biologie moléculaire comme l'amplification génomique par PCR (Polymerase Chain Reaction) ont permis de détecter les entérovirus en faible quantité en choisissant des amorces dans les régions très conservées. Cependant, elles ne permettent pas de détecter toutes les infections entérovirales, en particulier si l'infection est localisée et le taux de réplication du virus faible, ni de différencier tel ou tel sérotype. De même, les techniques immunoenzymatiques différencient tout au plus les groupes et celles-ci, basées sur la détection des anticorps neutralisants, se sont heurtées à l'absence d'un antigène commun parmi les entérovirus.

Il n'existe donc pas parmi ces tests une méthode de détection très fine à l'échelon du sérotype ou des variants (différenciation entre souches sauvages et vaccinales) ni de méthode de quantification de la charge virale chez des individus infectés.

Pour combler ce manque, la Demanderesse a développé un test de diagnostic in vitro des entérovirus spécifique et quantitatif. Ce test repose sur l'existence d'antigènes induisant des anticorps "facilitant" l'infection virale et pas d'anticorps neutralisants.

En effet, la Demanderesse a identifié la protéine virale présentant le ou les épitopes reconnus par les anticorps "facilitants" dans le cas d'une infection aux coxsackievirus B3 et B4. Cette protéine est la protéine structurale interne VP4 et la démonstration en a été faite comme suit :

a) tout d'abord, les virus CVB3 et CVB4 E2 ont été cultivés et purifiés

b) ensuite, les protéines VP4 d'une part et l'antigène H (également appelé AEC pour "artificial empty capsids")

d'autre part ont été isolés et purifiés à partir des virus CVB3 et CVB4 E2 dissociés

c) enfin, il a été démontré que la protéine VP4 inhibe l'augmentation de la production d'IFN $\alpha$  induite par le couple  
5 CVB/plasma. En effet, quand VP4 est préincubée avec du plasma avant d'ajouter CVB, VP4 fixe les anticorps anti-VP4 et il reste moins d'anticorps anti-VP4 pour fixer CVB et faciliter l'infection de PBMC in vitro et l'augmentation de la production d'IFN $\alpha$  par celles-ci. Ceci prouve que les  
10 anticorps "facilitants" sont les anticorps anti-VP4.

Par contre, il n'y a pas de réaction croisée entre les anticorps anti-VP4<sub>CVB3</sub> et anti-VP4<sub>CVB4</sub>. Quand VP4<sub>CVB4</sub> a été préincubée avec du plasma avant d'ajouter CVB3, le niveau d'IFN $\alpha$  induit par CVB3 dans des cultures de PBMC est resté  
15 inchangé. De même, la protéine VP4 dissociée de CVB3 n'affecte pas le niveau d'IFN $\alpha$  induit par CVB4. Les épitopes présentés par les protéines VP4 de ces deux sérotypes sont donc suffisamment différents pour que les anticorps "facilitants" soient spécifiques de tel ou tel sérotype.

20 La Demanderesse a tiré parti de cette démonstration pour mettre au point un test de diagnostic in vitro d'entérovirus basé sur la révélation d'une réaction immunologique de type reconnaissance antigène-anticorps caractérisé en ce qu'il met en oeuvre des antigènes ou des  
25 épitopes de ceux-ci qui n'induisent pas d'anticorps antiviraux neutralisants mais qui induisent des anticorps "facilitants" qui augmentent l'infection virale.

La présente invention a donc pour objet un test de diagnostic d'entérovirus caractérisé en ce que soit les  
30 antigènes sont fixés sur un support pour la détection des anticorps "facilitants" correspondants, soit les anticorps "facilitants" sont fixés sur un support pour la détection des antigènes correspondants. Ce support est de type plaque à puits multiples pour microtitration ou "puce". On entend  
35 par "puce" un support miniaturisé plat, en matériau solide organique ou inorganique, de type verre, silicium ou polymères synthétiques, sur lequel sont liés de manière covalente des polypeptides.

Quand le test selon l'invention consiste en la détection des anticorps "facilitants" par les antigènes correspondants fixés sur un support, la réaction est révélée par un anticorps secondaire anti-espèce marqué (par exemple anti-humain).

Quand le test selon l'invention consiste en la détection des antigènes par les anticorps "facilitants" correspondants fixés sur un support, la réaction est révélée par un anticorps anti-viral marqué ou par un anticorps anti-viral (par exemple humain) puis un anticorps secondaire anti-espèce marqué (par exemple anti-humain).

Le marqueur des anticorps secondaires est de préférence une enzyme comme la HRP ("horseradish peroxydase") qui montre une réaction colorée ou luminescente avec son substrat, un radioisotope, un composé fluorescent, un composé chimioluminescent, un composé bioluminescent ou un chélate de métaux.

On préfère en tant qu'antigène induisant des anticorps antiviraux "facilitants" une protéine virale interne, pleine longueur ou un fragment de celle-ci. Cette protéine peut être purifiée à partir du virus, peut être une protéine recombinante présentant les mêmes propriétés immunogènes ou peut être synthétisée chimiquement et présenter les mêmes propriétés immunogènes.

En particulier, on préfère que la protéine virale interne en question soit la protéine structurale VP4.

Ce test permet en particulier de diagnostiquer une infection par les coxsackievirus de type A ou B

Ce test comprend les étapes suivantes:

- a- immobilisation des anticorps "facilitants" ou de la protéine virale induisant des anticorps "facilitants" ou d'un fragment de celle-ci sur un support
- b- immobilisation de protéines contrôles ou d'un fragment de celles-ci sur un support
- c- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration
- d- saturation de la surface de support non recouverte par une solution tamponnée de protéines irrelevantes

- e- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration
- f- application des échantillons à étudier à différentes dilutions dans du tampon de saturation
- 5 g- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration
- h- amplification de la réponse par application d'anticorps marqués
- i- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration
- 10 j- lecture de l'intensité du marquage

Le test de l'invention peut en particulier être mis en oeuvre à l'aide d'un coffret ou d'un kit qui comprend :

- les antigènes ou les anticorps "facilitants" selon l'invention,
- 15 - les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction antigène-anticorps,
- les réactifs permettant la détection du complexe formé.

Selon l'invention le test peut notamment être appliqué au diagnostic d'une infection à CVB3 ou CVB4 par détection et dosage des anticorps anti-VP4 en les piégeant par la protéine purifiée VP4 fixée à un support. En effet, on a mis en évidence l'existence d'une relation dose-réponse entre la quantité de protéine VP4 préincubée avec le plasma et le niveau de production d'IFN $\alpha$ . Ainsi, la protéine VP4 préincubée avec le plasma piège les anticorps anti-VP4 du plasma. Plus on augmente la quantité de protéine VP4 dans ce test, plus on diminue la quantité d'anticorps anti-VP4 "facilitants" libres pour reconnaître CVB, plus la production d'IFN $\alpha$  est faible. On a de plus mis en évidence l'existence d'une corrélation dose-dépendante entre la quantité d'anticorps anti-VP4 préincubés avec CVB3 ou CVB4 avant d'être ajoutés à des PBMC et le niveau de production d'IFN $\alpha$ . Aucune production d'IFN $\alpha$  n'est détectée en présence de plasma appauvri en anticorps anti-VP4 ou d'anticorps 35 irrelevants.

Le test objet de l'invention, en permettant de doser les anticorps "facilitants" ou la protéine virale portant le



ou les épitopes reconnus par ces anticorps, permet de mesurer la réponse des cellules à l'infection virale, comme par exemple la production d'IFN $\alpha$ .

Le test décrit ci-dessus peut être réalisé avec  
5 d'autres protéines VP4 d'autres entérovirus pour effectuer un criblage de l'infection par différents virus.

Ce test peut être appliqué dans le cas de maladie chronique associée à une infection par un entérovirus pour établir la valeur prédictive du déclenchement de la maladie.  
10 En particulier, ce test peut être utilisé pour prédire le déclenchement chez des patients prédiabétiques d'un diabète de type 1 associé à une infection par CVB.

Ce test peut également être utilisé pour corrélérer la quantité d'anticorps facilitants détectés et le stade de la  
15 maladie. En particulier, ce test peut permettre d'évaluer le stade d'un diabète de type 1 associé à une infection par CVB.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

20

Légende des figures:

Figure 1 : effet de la protéine VP4 ou de l'antigène H sur la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB/plasma de 5 sujets sains

25 Figure 1a : diminution dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB3/plasma en présence de la protéine VP4<sub>CVB3</sub>

Figure 1b : augmentation dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB3/plasma en présence d'antigène H

30 Figure 1c : diminution dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB4/plasma en présence de la protéine VP4<sub>CVB4</sub>

Figure 1d : augmentation dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB4/plasma en présence d'antigène H

35 Figure 2 : comparaison de la moyenne des valeurs indice d'anticorps anti-VP4 des patients IDDM par rapport à celle des sujets sains

Exemple 1: Mise en évidence de la protéine virale de CVB3 ou CVB4 induisant des anticorps "facilitants" anti-CVB3 ou anti-CVB4 :

a) Culture et purification des virus CVB3 et CVB4:

5 CVB3 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) et CVB4 E2 diabétogène (fourni par Ji-Won Yoon, Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canada) ont été cultivés dans les cellules Hep-2 (Biowhittaker, Verviers, Belgique) en milieu essentiel  
10 minimum de Eagle (Gibco BRL, Eragny, France) additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (Gibco BRL) et 1% de L-Glutamine (Eurobio, France). Après une incubation de 24 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, la suspension cellulaire a été congelée et décongelée trois fois et  
15 centrifugée à 2000 x g pendant 10 min. Le virus issu du surnageant a été culotté par centrifugation à 500 000 x g pendant 3 heures à 4°C dans un rotor Beckman TLA-100.4. Le culot a été resuspendu dans 3 ml de Tris-HCl 0,01 M pH 7.2, contenant 0.5% (vol/vol) Nonidet P40, incubé à 4°C pendant  
20 20 heures, homogénéisé, et centrifugé à 4000 x g pour ôter les débris insolubles. Seulement 0,5 ml de la suspension virale clarifiée a été disposé en couches sur 0,5 ml de sucrose (30%, poids/vol) et 3 ml CsCl (40%, poids/vol). Après centrifugation à 348,000 x g à 4°C dans un rotor  
25 Beckman TLA-100.4 pendant 4 h, les fractions du gradient ont été récupérées et les titres viraux des fractions du gradient ont été déterminées par le test de la dose infectieuse de 50% de la culture tissulaire (TCID<sub>50</sub>) sur une culture confluyente de cellules Hep-2. Les fractions  
30 contenant les titres au pic d'infectiosité ont été groupées, dialysées et équilibrées avec du Tris-HCl 0,01 M pH 7.2 par centrifugation à 4000 x g sur membrane Macrosept<sup>TM</sup> (pall Filtron Corporation, Saint Germain en Laye, France) à exclusion de poids moléculaire (MWCO) de 300 K. Des aliquots  
35 ont été stockés congelés à -80°C. Des préparations contrôles ont été obtenues par le même protocole excepté que les cellules Hep-2 étaient infectées uniquement par le solvant du virus.

b) Purification de la protéine VP4 et de l'antigène H des virus CVB3 et CVB4

La protéine VP4 et l'antigène H ont été dissociés des virus complets CVB3 et CVB4 comme décrit précédemment dans la littérature pour le poliovirus (Maizel et al., 1967).  
Brièvement, les particules virales CVB purifiées et concentrées (~ 1 mg) ont été incubées à 56°C pendant 5 min dans 0,5 ml de tampon sodium (NaCl 0.1 M, NaCl 0.005 M, pH 7.0). Ce traitement résulte en la dissociation de l'ARN, VP4 et l'antigène H. VP4 a été séparée du mélange par centrifugation à 4000 x g sur membrane Macrosep<sup>TM</sup> à MWCO de 100 K. L'antigène H et l'ARN ont été retenus par la membrane, et VP4 est passée au travers de la membrane. L'ARN a été dégradé par ajout de 0,05 mg de ribonucléase A bovine pancréatique (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne) et incubation à 37°C pendant 10 min. L'antigène H et VP4 ont été dialysés et équilibrés avec du tampon phosphate salin (PBS), pH 7.2, par centrifugation à 4000 x g sur membranes Macrosep<sup>TM</sup> à MWCO de 100 K et 3 K respectivement. L'antigène H et VP4 ont été concentrés en utilisant un Savant Speed Vac Concentrator SVC100H (Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA). La dissociation contrôle a été de même opérée avec le surnageant de cellules Hep-2 non-infectées purifié tel que décrit ci-dessus et a fourni des protéines contrôles pour ce qui suit. La concentration protéique a été calculée à partir de l'absorbance à 280 nm correspondant à un coefficient d'extinction de 1 mg/ml.

c) Inhibition par la protéine VP4 de la production d'IFN $\alpha$  induite par le couple CVB/plasma :

VP4, l'antigène H ou des protéines contrôles ont été préincubés pendant 1h à 37°C à différentes concentrations avec du plasma de 5 sujets sains et dilué à une dilution optimale (1/10 ou 1/100). CVB3 ou CVB4 ont alors été ajoutés pendant 1h avant l'incubation avec des PBMC. On observe sur la Figure 1, une diminution dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  induite par CVB3/plasma en présence de la protéine VP4<sub>CVB3</sub> alors qu'en présence de l'antigène H on n'observe pas

de diminution dose-dépendante de la production d'IFN $\alpha$  (Figure 1a et 1b). Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine VP4<sub>CVB4</sub> dans le système CVB4/plasma (Figure 1c et 1d). Au contraire, les protéines contrôles isolées à partir de cellules Hep-2 non infectées n'ont eu aucun effet sur la production d'IFN $\alpha$ .

Exemple 2: Diagnostic d'une infection à CVB3 ou CVB4 grâce à la détection des anticorps anti-VP4 - Corrélation entre la détection des anticorps anti-VP4 de CVB3 et CVB4 et le diabète de type 1

Pour détecter les anticorps anti-VP4 dans le plasma d'un donneur, des plaques de microtitration de 96 puits ont été hybridées pendant une nuit à température ambiante avec la protéine VP4 dissociée à partir de CVB3 ou CVB4 à 5  $\mu$ g/ml dans du PBS pH 7.4. De la même façon, des plaques de microtitration ont été hybridées avec des protéines contrôles. Les puits ont été lavés trois fois avec une solution de lavage (PBS pH 7.4, 0,05% Tween 20), saturés pendant 1 h à 37°C avec du tampon de saturation (PBS, pH 7.4, 2,5% lait écrémé, 0,5% Tween 20), et lavés à nouveau 4 fois. Ensuite, 0,1 ml des échantillons, dilués dans du tampon de saturation à une dilution optimale (1/50), ont été ajoutés aux micropuits. Après 2 h d'incubation à température ambiante, les puits ont été lavés 4 fois et 0,1 ml du mélange d'anticorps IgA, G, M anti-humains marqués à la HRP ("horseradish peroxydase") dilué au 1/10000ème ont été ajoutés et incubés pendant 1 h. Après 4 cycles de lavage, 0,1 ml de la solution substrat (0,4 mg/ml o-phénylènediamine, 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du tampon phosphate citrate 0,05 M, pH 5.0) ont été ajoutés pendant 30 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 25  $\mu$ l d'acide sulfurique 2 N. Les mesures de l'absorbance ont été effectuées à 490 nm dans un lecteur de microplaques Dynex MRX® (Thermo Life Science, Cergy-Pontoise, France). La valeur limite du test immunologique a été déterminée en additionnant l'absorbance de l'échantillon sur les plaques contrôles à celle du blanc sur les plaques VP4. Les

échantillons du test avec un indice (ratio échantillon/valeur limite) supérieur à 1,0 ont été considérés comme positifs pour la présence d'anticorps anti-VP4.

5 Ce test a été utilisé pour détecter et doser les anticorps anti-VP4 dans le plasma de sujets sains et de patients IDDM. 14 des 40 sujets sains (35%) et 25 des 40 patients IDDM (62,5%) étaient positifs pour les anticorps anti-VP4<sub>CVB3</sub>. 6 des 40 sujets sains (15%) et 32 des 40  
10 patients IDDM (80%) étaient positifs pour les anticorps anti-VP4<sub>CVB4</sub>. La moyenne des indices obtenue dans le groupe des patients IDDM était significativement plus élevée que celle obtenue dans le groupe des sujets sains (Figure 2).

Le test développé dans cet exemple montre que la  
15 détection et le dosage des anticorps anti-VP4 peuvent être utilisés dans le diagnostic d'une pathologie associée à une infection aux coxsackievirus. En effet, les patients IDDM présentent une plus forte prévalence d'anticorps anti-VP4 et une plus grande quantité de ces anticorps que les sujets  
20 sains.

Certains patients présentent un taux d'anticorps anti-VP4 au-dessous du seuil de détection du test de l'exemple mais ceci peut s'expliquer par le fait que leur maladie est associée à d'autres virus que CVB3 ou CVB4 comme CVB2.

## REVENDICATIONS

1- Test de diagnostic in vitro d'entérovirus basé sur la révélation d'une réaction immunologique de type reconnaissance antigène-anticorps caractérisé en ce qu'il met en oeuvre des antigènes ou des épitopes de ceux-ci qui  
5 n'induisent pas d'anticorps antiviraux neutralisants mais qui induisent des anticorps "facilitants" qui augmentent l'infection virale.

2- Test de diagnostic selon la revendication 1 caractérisé en ce que la réaction immunologique de type  
10 reconnaissance antigène-anticorps est révélée soit par un anticorps anti-espèce marqué quand le test selon l'invention consiste en la détection des anticorps "facilitants" par les antigènes correspondants fixés sur un support, soit par un anticorps anti-viral marqué ou par un anticorps anti-viral  
15 puis un anticorps secondaire anti-espèce marqué quand le test selon l'invention consiste en la détection des antigènes par les anticorps "facilitants" correspondants fixés sur un support.

3- Test de diagnostic selon la revendication 2  
20 caractérisé en ce que l'anticorps marqué porte un marqueur de type enzyme, radioisotope, composé fluorescent, composé chimioluminescent, composé bioluminescent ou chélate de métaux.

4- Test de diagnostic selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'antigène induisant des anticorps antiviraux "facilitants" est une protéine virale interne.

5- Test de diagnostic selon la revendication 4 caractérisé en ce que la protéine virale interne est la  
30 protéine pleine longueur ou un fragment de celle-ci.

6- Test de diagnostic selon la revendication 4 ou 5 caractérisé en ce que la protéine virale interne ou un fragment de celle-ci est obtenu soit par purification à partir du virus, soit est une protéine recombinante  
35 présentant les mêmes propriétés immunogènes, soit est synthétisée chimiquement et présente les mêmes propriétés

immunogènes.

7- Test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 4 à 6 caractérisé en ce que la protéine virale interne est la protéine structurale VP4.

5 8- Test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que les entérovirus diagnostiqués sont les coxsackievirus de type A ou B

9- Test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que sa mise en oeuvre  
10 comprend la succession des étapes suivantes:

a- immobilisation des anticorps "facilitants" ou de la protéine virale induisant des anticorps "facilitants" ou d'un fragment de celle-ci sur un support

b- immobilisation de protéines contrôles ou d'un fragment de  
15 celles-ci sur un support

c- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration

d- saturation de la surface de support non recouverte par une solution tamponnée de protéines irrelevantes

20 e- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration

f- application des échantillons à étudier à différentes dilutions dans du tampon de saturation

g- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou  
25 non d'un détergent à faible concentration

h- amplification de la réponse par application d'anticorps marqués

i- lavages avec une solution saline tamponnée additionnée ou non d'un détergent à faible concentration

30 j- lecture de l'intensité du marquage

10- Test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que les antigènes ou les anticorps "facilitants" correspondants sont fixés sur un support de type plaque à puits multiples pour  
35 microtitration.

11- Test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que les antigènes ou les anticorps "facilitants" correspondants sont fixés sur un

support de type puce.

12- Coffret ou kit pour la mise en oeuvre d'un test de diagnostic in vitro d'entérovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 qui comprend :

- 5 - les antigènes ou les anticorps "facilitants",
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction antigène-anticorps,
- les réactifs permettant la détection du complexe formé.

10 13- Utilisation du test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour prédire le déclenchement d'une pathologie chronique associée à une infection par un entérovirus.

15 14- Utilisation du test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour prédire le déclenchement d'un diabète de type 1 chez un patient prédiabétique.

20 15- Utilisation du test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour définir le stade d'une pathologie chronique associée à une infection par un entérovirus.

16- Utilisation du test de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour définir le stade d'un diabète de type 1 associé à une infection par CVB.

25

30

35



1 / 2

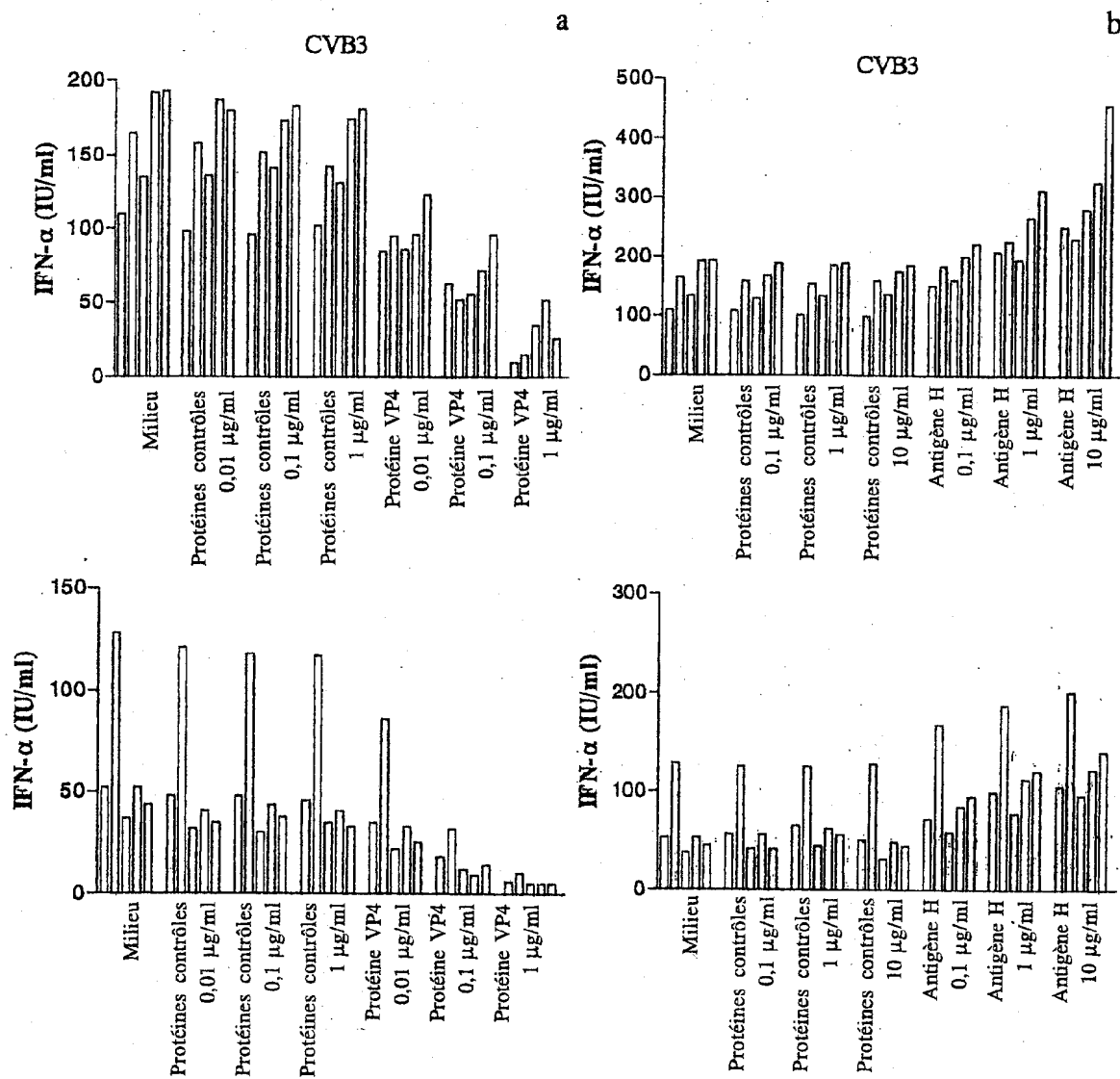
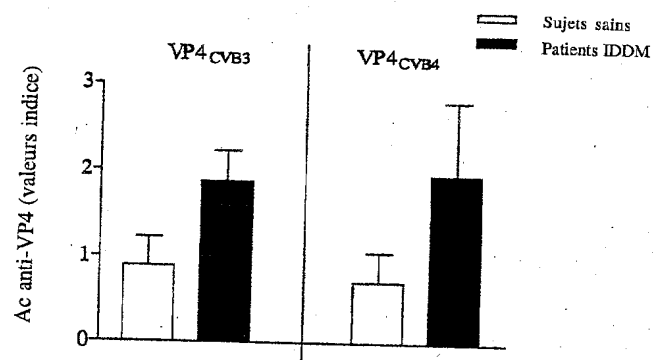


FIG. 1

2 / 2

**FIG. 2**



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 629516  
FR 0301454

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 434 992 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 3 juillet 1991 (1991-07-03) * le document en entier *	1-16	G01N33/569
Y	HOBER DIDIER ET AL: "Circulating and cell-bound antibodies increase coxsackievirus B4-induced production of IFN-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 1 diabetes." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 83, no. 9, septembre 2002 (2002-09), pages 2169-2176, XP002243774 September, 2002 ISSN: 0022-1317 * le document en entier *	1-16	
Y	CHEHADEH WASSIM ET AL: "Human antibodies isolated from plasma by affinity chromatography increase the coxsackievirus B4-induced synthesis of interferon-alpha by human peripheral blood mononuclear cells in vitro." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 82, no. 8, août 2001 (2001-08), pages 1899-1907, XP002243775 ISSN: 0022-1317 * le document en entier *	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  G01N
Y	GIRN JASKAMAL ET AL: "Enhancement of coxsackievirus B3 infection by antibody to a different coxsackievirus strain." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 83, no. 2, février 2002 (2002-02), pages 351-358, XP002243776 February, 2002 ISSN: 0022-1317 * le document en entier *	1-16	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 juin 2003		Stricker, J-E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12-99 (P04C14)



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

**N° d'enregistrement national**

FA 629516  
FR 0301454

<b>DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b>		Revendication(s) concernée(s)	<b>Classement attribué à l'invention par l'INPI</b>
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	DE 198 46 271 A (VIRAGEN VIRUS ANTIGENE GMBH) 13 avril 2000 (2000-04-13) * le document en entier * -----	1-16	
			<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</b>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 juin 2003		Stricker, J-E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0301454 FA 629516**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **10-06-2003**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0434992 A	03-07-1991	DE 3939200 A1	29-05-1991
		EP 0434992 A1	03-07-1991
		JP 3183483 A	09-08-1991
DE 19846271 A	13-04-2000	DE 19846271 A1	13-04-2000